

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno - matematički fakultet
Biološki odsjek

WARBURG EFEKT: METABOLIZAM STANICA RAKA WARBURG EFFECT: CANCER CELLS METABOLISM

Bojana Križnik

Preddiplomski studij molekularne biologije
Undergraduate programme of Molecular Biology
Mentor: doc.dr.sc. Ita Gruić-Sovulj

Zagreb, 2011.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. ZAŠTO STANICE RAKA AKTIVIRAJU GLIKOLIZU U PRISUSTVU KISIKA?	3
3. MOGUĆI MEHANIZMI UTIŠAVANJA MITOHONDRIJA U STANICAMA RAKA	5
3.1 Crabtree efekt	5
3.2 HIF i supresija mitohondrijske aktivnosti	5
3.3 Važnost reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama raka	8
4. POSLJEDICE PRELASKA NA GLIKOLIZU	11
5. INHIBICIJA GLIKOLIZE: STRATEGIJE I LIJEKOVI	12
6. ZAKLJUČAK	14
7. LITERATURA	15
SAŽETAK	17
SUMMARY	18

1. UVOD

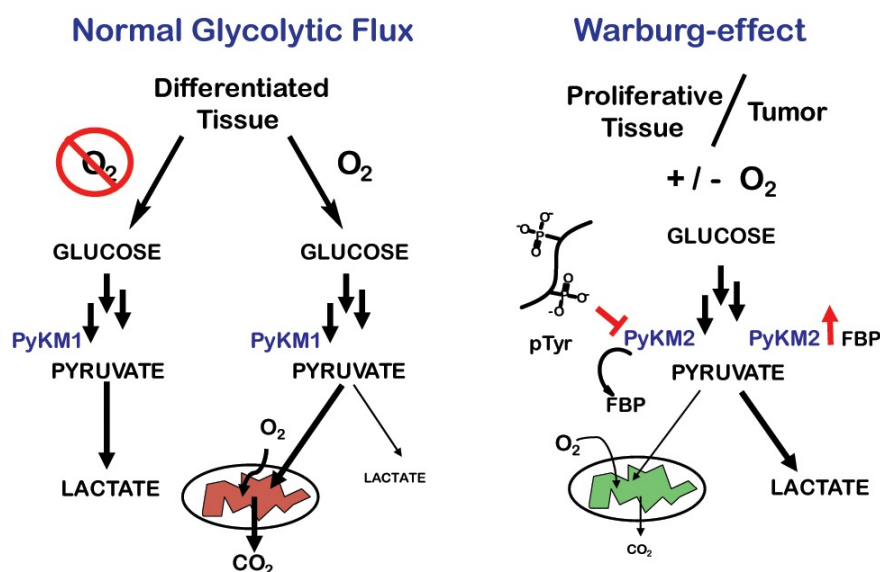
Rak (maligni tumor) je genetski poremećeni rast stanica uzrokovan višestrukim promjenama u ekspresiji gena, koji dovodi do neravnoteže između stanične proliferacije i stanične smrti uzrokujući stvaranje populacije stanica koje mogu naseljavati tkiva i metastazirati na udaljena mjesta. Stanice raka uvelike se razlikuju od normalnih diferenciranih stanica, a šest obilježja raka su: neovisnost o faktorima rasta, izbjegavanje inhibitornih signala rasta, neograničen replikativni potencijal (besmrtnost stanice), angiogeneza (poticanje formacije novih krvnih žila kako bi stanice raka dobivale dovoljno nutrijenata za rast), invazija i metastaziranje, te na posljepku nemogućnost programirane stanične smrti stanica raka (apoptoza) (Pecorino, 2008).

Postoje dva načina na koji stanice sisavaca dobivaju energiju: fermentacijom glukoze do laktata i aerobnom respiracijom. U uvjetima kada nema dovoljno kisika, stanica proizvodi ATP temeljno glikolizom koja se odvija isključivo u citosolu. U procesu glikolize molekula glukoza se cijepa na dvije molekule piruvata, pri čemu nastaju dvije molekule ATP-a. U reakciji se troši NAD^+ nužan za odvijanje glikolize, koji se regenerira prilikom redukcije piruvata u laktat. Većina energije potrebne za život stanice se proizvodi reakcijama oksidativne fosforilacije (OKSFOS) u mitohondriju gdje se sav ugljik iz glukoze potpuno oksidira do ugljikovog dioksida (CO_2), a molekularni kisik, krajnji primatelj elektrona s NADH i FADH_2 nastalih u ciklusu limunske kiseline, se reducira do vode (H_2O). Ovaj proces povezuje oksidaciju NADH i FADH_2 s fosforilacijom ADP u ATP, koji predstavlja izvor kemijske energije stanice. OKSFOS ovisi o kisiku, jer je on krajnji primatelj elektrona nastalih oksidacijom NADH i FADH_2 . Također to je mnogo efikasniji proces nastanka ATP-a od glikolize; oksidacijom jedne molekule glukoze preko OKSFOS-a nastaje 30 ATP-a, dok glikolizom samo 2 ATP-a (Nelson i Cox, 2005). Razumljivo je da će stanice radije koristiti OKSFOS ukoliko imaju dovoljno kisika. Krajem 19. st., Pasteur je opazio da se smanjenjem količine kisika proizvodnja ATP-a iz OKSFOS-a prebacuje na glikolizu. Njemu u čast ovaj fenomen je nazvan Pasteurov efekt (Gatenby i Gillies, 2004; López-Lazaro, 2008; Ferreira, 2010; Gogvadze i sur, 2010).

Tijekom prve polovice 20. st., proučavajući metabolizam u tkivima napadnutim rakom, Otto Warburg je primjetio da stanice raka pokazuju povećanu glikolizu usprkos dostatnoj količini kisika, odnosno uočena je pojačana potrošnja glukoze i akumulacija velike količine laktata (Warburg, 1956). Ovo opažanje bilo je kontradiktorno ranije spomenutom Pasteurovom efektu. Pojava je nazvana aerobna glikoliza ili Warburgov efekt, a uočena je u gotovo svih vrsta raka, te se danas koristi kao glavna karakteristika raka prilikom dijagnoze pomoću pozitron emisijske tomografije

(PET). Stanice raka u početku nemaju dovoljno razvijenu mrežu kapilara kojima bi se tkivu dopremale hranjive tvari i najvažnije kisik, stoga takve stanice žive u uvjetima hipoksije. Kao rezultat toga, stanice raka ovise o anaerobnoj glikolizi kako bi stvorile većinu ATP-a (Vander Heiden i sur, 2009). Već je nekoliko desetljeća poznato da metabolički prijelaz sa OKSFOS-a na aerobnu glikolizu nije jedinstvena pojava kod tumorskih stanica, već je uočena i u normalnim diferenciranim stanicama u proliferaciji. Ova eksperimentalna opažanja povlače dva važna pitanja. Prvo, ako je OKSFOS efikasniji metabolički put stvaranja ATP-a od glikolize, zašto stanice raka i ne-transformirane stanice u proliferaciji povećavaju intenzitet aerobne glikolize kada je količina kisika dostatna? Drugo, ako kisik smanjuje intenzitet glikolize (Pasteurov efekt), kako stanice uspijevaju aktivirati glikolizu?

Normalne stanice i stanice raka koriste i glukozu i glutamin kao supstrat za sintezu ATP-a, te za stvaranje prekursora za sintezu aminokiselina, nukleozida i masnih kiselina (Dang, 2010). Važno je napomenuti i da ciklus limunske kiseline ima važnu ulogu kada govorimo o stvaranju prekursora za biosintetske puteve, jer je upravo on zaslužan za stvaranje mitohondrijskog citrata koji se prenosi u citosol gdje se kemijskim reakcijama prevodi u acetil-CoA, prekursor lipida, oksaloacetat, te prekursor aminokiselina. Uzmemo li to u obzir dolazimo do zaključka da ciklus limunske kiseline nikada nije potpuno obustavljen, već mu se kod stanica raka aktivnost smanjuje. Stanice također reguliraju redoks potencijal kako bi se minimizirao štetni utjecaj reaktivnih kisikovih vrsta na stanične membrane i proteine (DeBerardinis, 2008; Samudio i sur, 2009; Vander Heiden i sur, 2009).



Slika 1. Usporedba glikolitičkog puta u normalnim stanicama i proliferativnim/tumorskim stanicama u uvjetima nedostatne i dostatne količine kisika; PyKM - piruvat kinaza (preuzeto sa: <http://www.beilstein-institut.de>)

2. ZAŠTO STANICE RAKA AKTIVIRAJU GLIKOLIZU U PRISUSTVU KISIKA?

Prvo objašnjenje fenomena aerobne glikolize dao je Otto Warburg. Predložio je da kod stanica raka do povećane aerobne glikolize, bez obzira na prisutnost kisika, dolazi uslijed ireverzibilnog oštećenja OKSFOS-a (Warburg, 1956; Racker i Spector, 1981). Iako je njegovo objašnjenje u početku naišlo na velike kritike, novija istraživanja rezultirala su dvijema strujama: jedna zagovara Warburgovo stajalište, dok ga druga opovrgava. Istraživanja na stanicama najčešćih rakova su pokazala smanjenu ekspresiju katalitičke podjedinice ATP sintaze (β -F1-ATPaze), proteinskog kompleksa nužnog za odvijanje OKSFOS-a, te pojavu mitohondrijskih mutacija, koje dovode do obustave OKSFOS-a. Iznenadujuće, razina ekspresije β -F1-ATPaze je bila obrnuto proporcionalna brzini aerobne glikolize. Povezanost disfunkcije mitohondrija i povećane glikolize je dokazana na *in vitro* modelu, gdje je inhibicija OKSFOS-a oligomicinom u stanicama karcinoma pluća prouzročila nagli porast aerobne glikolize (López-Lázaro, 2008).

Pokazano je i da inaktivacija p53 onkogeni može potaknuti Warburgov efekt. Proteinski produkt p53 gena inhibira članove proteinske obitelji Bcl-2 zadužene za održavanje stabilnosti i permeabilnosti vanjske membrane mitohondrija, što za posljedicu ima otpuštanje citokroma c oksidaze, proteinskog kompleksa karakterističnog za OKSFOS, iz mitohondrija (Endo i sur, 2006; Matoba i sur, 2006). Međutim, neka istraživanja su pokazala da inhibicija glikolize u stanicama raka dovodi do povećanja oksidativne fosforilacije, što navodi na zaključak da Warburgov efekt nije uzrokovan ireverzibilnim oštećenjem oksidativne fosforilacije (López-Lázaro, 2008).

Biokemijski gledano, osim što proizvodi ATP, glikoliza služi i kao izvor ugljikovih kostura za biosintetske puteve. To implicira da je aktivacija glikolize esencijalna za staničnu proliferaciju, pošto proliferacija stanica zahtjeva energiju za sintezu novih molekula, građevnih jedinica (npr. nukleinske kiseline, lipidi, proteini), a glikoliza zadovoljava većinu zahtjeva stanice (Nelson i Cox, 2005). Esencijalna uloga glikolize prilikom stanične proliferacije je pokazana eksperimentima koji su otkrili da normalne stanice i stanice raka, ukoliko se uzgajaju na mediju bez glukoze, ili se tretiraju 2-deoksiglukozom, analogom glukoze koje stanice ne mogu metabolizirati, pokazuju vrlo slabu aktivnost glikolize, što dovodi do zaključka da normalne stanice i stanice raka pojačavaju glikolizu prilikom proliferacije bez obzira na količinu kisika (DeBerardinis i sur, 2008; Hsu i Sabatini, 2008; Feron, 2009). Drugim riječima, kada bi glikoliza u prisustvu kisika bila inhibirana, stanice se ne bi mogle dijeliti dovoljno brzo.

No, glikoliza nije pojačana samo za vrijeme proliferacije. Čini se da aerobna glikoliza igra važnu ulogu u zaštiti stanice od stanične smrti uzrokovane reaktivnim kisikovim vrstama kao što je

vodikov peroksid (Ruckenstuhl i sur, 2009). Također, iako oksidativna fosforilacija stvara više ATP-a po molekuli glukoze nego glikoliza, glikoliza se odvija brže, stoga je sposobna brže proizvesti ATP ukoliko ima neograničene količine glukoze. Stanice koje rastu zahtjevaju ogromnu količinu ATP-a, a glikoliza čini se bolje zadovoljava zahtjeve od oksidativne fosforilacije (Bartrons, 2007; Ferreira, 2010).

3. MOGUĆI MEHANIZMI UTIŠAVANJA MITOHONDRIJA U STANICAMA RAKA

3.1 Crabtree efekt

Mali doprinos mitohondrija u stvaranju staničnog ATP-a nije samo karakteristika stanica raka, već je karakteristika brzo-rastućih normalnih stanica. Povećana koncentracija glukoze ubrzava glikolizu što dovodi do stvaranja pozamašne količine ATP-a fosforilacijom ADP-a na razini supstrata. Time se smanjuje potreba za sintezom ATP-a OKSFOS-om, te potrošnjom kisika. Taj fenomen je nazvan Crabtree efekt (Gogvadze i sur, 2010).

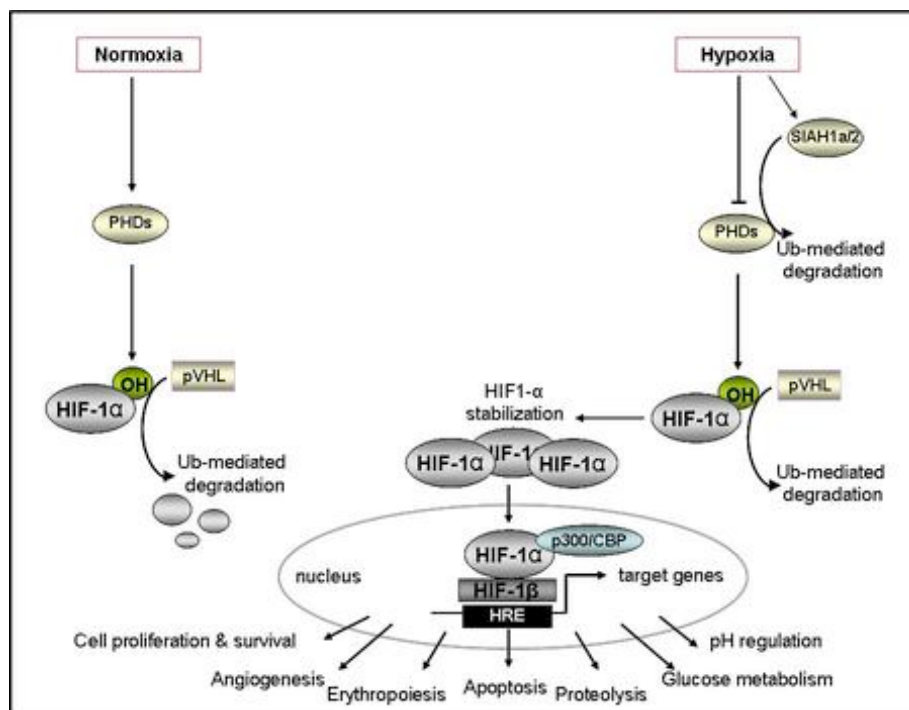
Predloženo je nekoliko mehanizama koji objašnjavaju ovaj efekt: (a) kompeticija između OKSFOS-a i glikolize za ADP i anorganski fosfat; (b) smanjenje citosolnog pH, kao posljedica nastanka laktične kiseline, smanjuje aktivnost oksidativnih enzima; (c) oštećenje mitohondrijske membrane slobodnim radikalima nastalim tijekom metabolizma glukoze; i (d) otpuštanje Ca^{2+} iona iz endoplazmatskog retikuluma inducirano glukozom, nakon kojega slijedi unos iona u mitohondrij gdje inhibiraju ATP sintazu. Potonje objašnjenje se podudara sa opaženom povećanom količinom Ca^{2+} iona u mitohondrijima stanica raka. Sva četiri mehanizma bi mogla doprinijeti Crabtree efektu, ali njihov relativni doprinos supresiji mitohondrija varira između različitih vrsta raka (Gogvadze i sur, 2010).

3.2 HIF i supresija mitohondrijske aktivnosti

Brza proliferacija je jedna od glavnih karakteristika stanica raka. Ona dovodi do stanja hipoksije u stanicama tumora zbog nemogućnosti lokalne vaskularne mreže da opskrbi stanice adekvatnom količinom kisika. Stoga, stanice raka se moraju adaptirati na nepovoljne uvjete dok se ne ostvari nova mreža žila i optimira dovod kisika (Pecorino, 2008). Ovakvi uvjeti su za normalnu stanicu u većini slučajeva letalni zbog indukcije stanične smrti uslijed hipoksije koju kontrolira proteinski produkt gena p53. Međutim, stanice raka mogu preživjeti u uvjetima hipoksije zbog mutacija u genu p53 ili njegove slabije ekspresije (Matoba i sur, 2006).

Pošto mitohondriji ne mogu stanicu opskrbiti energijom ukoliko nema dovoljno kisika, stanice raka moraju pojačati aktivnost glikolitičkog puta. To se odvija preko hipoksija-inducibilnog faktora-1 (HIF-1) (Levine i Puzio-Kuter, 2010; Stubbs i Griffiths, 2010). HIF-1 je heterodimer koji se sastoji od konstitutivno eksprimirane HIF-1 β podjedinice i HIF-1 α podjedinice. Ekspresija potonjeg je vrlo strogo regulirana i određena je relativnim brzinama sinteze i degradacije. Sinteza HIF-1 α proteina je regulirana mehanizmima neovisnim o kisiku, dok je njegova razgradnja ovisna o kisiku. Točnije, u prisustvu kisika lanci HIF-1 α proteina su polihidroksilirani na očuvanim

aminokiselinskim bočnim ograncima prolina i arginina djelovanjem enzima prolil- i arginil-hidroksilaza. Jednom hidroksiliran, HIF-1 α protein se veže za von Hippel-Lindau (VHL) tumor supresor protein, komponentu koju prepoznaje E3 ubikvitin-protein ligaza. Ubikvitinirani HIF-1 α se trenutno degradira proteosomima. U uvjetima niske količine kisika (hipoksija), hidroksilacija je inhibirana što stabilizira HIF-1 α , te dolazi do njegove akumulacije u jezgri, gdje stvara kompleks sa HIF-1 β koji je konstitutivno eksprimiran. HIF-1 inducira gene koji kontroliraju glavne karakteristike u biologiji raka, uključujući angiogenezu, metabolizam glukoze, staničnu proliferaciju i invaziju. Stimulira glavne korake glikolize poticanjem ekspresije prenositelja glukoze (GLUT) i enzima heksokinaze, prvog enzima glikolitičkog puta koji fosforilira glukozu. Potrebno je spomenuti i da u nekih vrsta raka postoji povećana razina HIF-1 u stanicama koje se nalaze u dobro oksigeniranom mediju, što nam govori da postoje drugi faktori koji mogu stabilizirati HIF-1 (Pecorino, 2008). Stabilizacija HIF-1 je opažena u vaskularnim stanicama glatkih mišića nakon tretmana s nekoliko hormona i faktora rasta poput fetalnog telećeg seruma, angiotenzina II, trombina itd. Razina HIF-1 u takvim stanicama bila je značajno veća nego u uvjetima hipoksije.



Slika 2. Shematski prikaz djelovanja HIF-1 faktora u uvjetima dostatne količine kisika i u uvjetima hipoksije (preuzeto sa: <http://www.ucl.ac.uk>)

Povećanje aktivnosti glikolitičkog puta nije jedina funkcija HIF-1 u stanici. Pokazano je da može suprimirati respiratornu aktivnost mitohondrija, što sugerira da HIF-1 ima ulogu “prekidača” između glikolize i OKSFOS-a (Stubbs i Griffiths, 2010). Postoji nekoliko mogućih mehanizama takve regulacije. Način nastajanje ATP-a ovisi o sudbini krajnjeg produkta glikolize - piruvata.

Sudbina piruvata pak ovisi o aktivnostima dvaju enzima, kompleksu piruvat-dehidrogenaze (PDH) i laktat-dehidrogenaze (LDH). Mitohondrijski enzim PDH pretvara piruvat u acetil-koenzim A (acetil-CoA), koji ulazi u ciklus limunske kiseline gdje nastaju NADH i FADH₂, glavni sudionici u reakcijama OKSFOS-a. Aktivnost PDH je pod kontrolom enzima kinaze piruvat-dehidrogenaze 1 (PDK1) koji fosforilacijom inaktivira PDH. Dokazano je da HIF-1 inducira PDK1 i time dovodi do inaktivacije PDH, a time i do supresije ciklusa limunske kiseline i OKSFOS-a. U takvim uvjetima, umjesto da se reducirani ekvivalenti usmjeravaju u mitohondrij, piruvat se pretvara u laktat, čime se regenerira citosolni NAD⁺ koji omogućava nastavak glikolize.

Uz inhibiciju OKSFOS-a, HIF-1 stimulira ekspresiju LDH-A gena, čiji produkt pretvara piruvat u laktat. LDH je tetrameran enzim koji postoji u pet izoforma sastavljenih od kombinacija dviju podjedinica, LDH-A i LDH-B. LDH-A podjedinica je zaslužna za pretvorbu piruvata u laktat pod anaerobnim uvjetima u normalnim stanicama. LDH-B kinetički favorizira konverziju laktata u piruvat, te je eksprimiran u velikim količinama u aerobnom tkivu, kao što je srčani mišić. Zajedno ovi faktori onemogućuju dostavu acetil-CoA ciklusu limunske kiseline i mitohondrijskoj respiraciji u stanicama raka. Supresija oksidacije piruvata kroz povećanje ekspresije PDK1 djelovanjem HIF-1 služi i kao mehanizam zaštite stanice od toksičnog učinka kisikovih reaktivnih vrsta. Ova tvrdnja je dokazana na mišjim embrionalnim fibroblastima koji su bili HIF-1 deficijenti - razina kisikovih reaktivnih vrsta je toliko narasla da je nastupila stanična smrt. Razina kisikovih reaktivnih vrsta i stanična smrt su značajno reducirani transfekcijom klonova sa ekspresijskim vektorom koji kodira PDK1. Ovime se jasno pokazuje da stimulacija mitohondrijskog puta proizvodnje energije može poslužiti kao efikasno oruđe u ubijanju tumorskih stanica.

Drugi mogući put kojim HIF-1 može modulirati mitohondrijsku funkciju u stanicama raka, konkretno aktivnost mitohondrijskog respiratornog lanca, je regulacija ekspresije citokrom-oksidaze (COKS), enzima lociranog na unutrašnjoj membrani mitohondrija (Matoba i sur, 2006; Gogvadze i sur, 2010). Enzim je građen od 13 podjedinica. Stanice sisavaca exprimiraju dominantnu izoformu COKS4-1. Alternativna izoforma COKS4-2 se također eksprimira, ali samo u određenim tkivima. Northern blot analize i kvantitativni PCR tkiva čovjeka i miša su otkrili visoku ekspresiju COKS4-2 u plućima odraslih jedinki, te njegovu nižu ekspresiju u drugim istraživanim tkivima, uključujući u plućima fetusa. U uvjetima hipoksije, ekspresija COKS4-2 se povećava, što optimira aktivnost COKS, dok ekspresija COKS4-1, odgovornog za aktivnost COKS u aerobnim uvjetima, opada, te dolazi do njegove razgradnje mitohondrijskim proteazama. Promjena razine aktivnosti navedenih dviju podjedinica enzima COKS omogućuje održavanje efikasnosti respiracije u uvjetima reducirane, odnosno optimalne količine kisika, te je moguće da je takav mehanizam

zaslužan za adaptivni odgovor na hipoksiju. U radu Fukunde i suradnika (Fukunda i sur, 2007), pokazano je da je u plućima i jetri miša ekspresija podjedinice COKS4-2 povećana, a COKS4-1 smanjena kada je tim organima bilo dostupno samo 10% kisika. Iz toga su zaključili da promjena razine ekspresije ovih dviju podjedinica predstavlja fiziološki odgovor na hipoksiju.

Signal za stimulaciju glikolize preko indukcije HIF-1 može također doći iz mitohondrija. Kada je mitohondrijska aktivnost u stanicama raka smanjena zbog hipoksije ili zbog nepravilnosti u radu kompleksa respiratornog lanca, dolazi do akumulacije intermedijera ciklusa limunske kiseline kao što su fumarat i suksinat, a oni služe kao signal za stimulaciju glikolize. Pokazano je da suksinat inhibira HIF-1 α prolin-hidroksilazu u citosolu, što dovodi do stabilizacije i aktivacije HIF-1 α . Akumulacija suksinata u mitohondriju je rezultat inhibicije enzima suksinat-dehidrogenaze, koji katalizira oksidativnu dehidrogenaciju suksinata povezanu s redukcijom ubikvinona. Mutacije u tom enzimu su prvenstveno povezane sa predispozicijom za benigne tumore, stoga suksinat-dehidrogenazu možemo smatrati klasičnim tumorskim supresorom.

3.3 Važnost reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama raka

Akumulacija kisikovih reaktivnih vrsta je jedan od faktora koji vode do disfunkcije mitohondrija. Tumorigenične su svojom sposobnošću povećanja stanične proliferacije i migracije, ali i indukcijom genetičkih lezija koje mogu potaknuti tumorigeničnost i podržati tumorsku progresiju. Velika većina stanica raka ima povećanu razinu kisikovih reaktivnih vrsta. Koji su onda mehanizmi stimulacije proizvodnje kisikovih reaktivnih vrsta u stanicama raka?

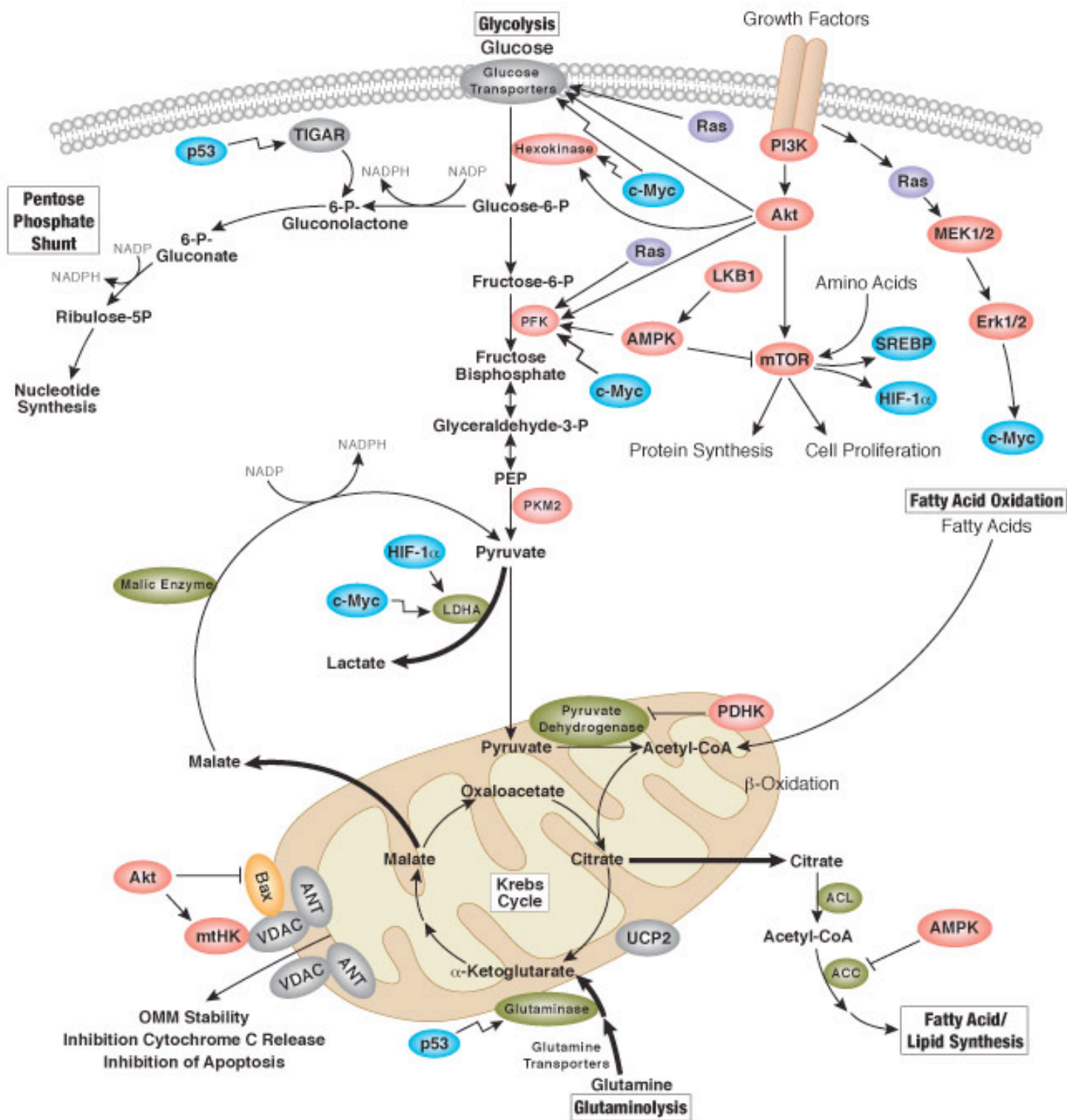
U većini stanica, najveći dio reaktivnih kisikovih vrsta čine nusprodukti mitohondrijske respiracije. Otprilike 2% molekulskog kisika konzumiranog tijekom respiracije se konvertira u superoksidni radikal - prekursor većine reaktivnih kisikovih vrsta. Mitohondrijski lanac transporta elektrona sadrži nekoliko redoks centara koji mogu otpustiti elektrone koji reduciraju kisik, stoga čine primarni izvor superoksidnih iona u tkivima. Redukcija kisika jednim elektronom je termodinamički povoljna za većinu mitohondrijskih oksido-reduktaza. Reaktivne kisikove vrste, ukoliko se ne uklone, oksidiraju stanične proteine, lipide i nukleinske kiseline, te time izazivaju staničnu disfunkciju ili smrt. Štetne kisikove vrste uklanja kaskada u vodi ili lipidima topivih antioksidanata i enzima s antioksidativnom aktivnošću.

Iako su mitohondriji veliki izvor kisikovih reaktivnih vrsta, također su i njihova meta. Reaktivne kisikove vrste koje proizvede mitohondrij oksidiraju proteine i induciraju lipidnu peroksidaciju, čime se narušava struktura membrane mitohondrija. Jedna od meta je mitohondrijska

DNA (mtDNA), koja kodira nekoliko esencijalnih proteina mitohondrijskog respiratornog lanca i OKSFOS-a, stoga oksidativno oštećenje može dovesti do letalne ozljede stanice uslijed gubitka mitohondrijskog elektronskog transporta, membranskog potencijala i sinteze ATP-a (Ruckenstuhl i sur, 2009).

Hipoksični okoliš proliferirajućih stanica pomaže nastanku reaktivnih kisikovih vrsta. Njihova masivna produkcija se normalno može uočiti prilikom reoksigenacije hipoksičnog tkiva. Međutim, razina kisikovih reaktivnih vrsta može narasti i tijekom hipoksije, kada su kompleksi elektronskog transportnog lanca u reduciranom stanju. Stoga produkcija reaktivnih kisikovih vrsta, posebice nakon normalizacije razine kisika u stanicama raka održavanim u uvjetima hipoksije, može povećati i izazvati oštećenja vitalnih komponenti stanice, te dovodi do ciklusa: hipoksija - nastanak reaktivnih kisikovih vrsta - mutacije mtDNA - gubitak pravilne funkcije mitohondrijskog respiratornog lanca - ponovna stimulacije nastanka reaktivnih kisikovih vrsta - itd (Kondoh, 2008; Ferreira, 2010).

Povećana razina kisikovih reaktivnih vrsta povećava unutarstanični pH, a povećani pH povećava aktivnost enzima glikolitičkog puta fosfofruktokinaze-1 (FFK-1); aktivnost ovoga enzima iznimno je osjetljiva na male promjene pH vrijednosti. No, iako je aktivacija ovoga enzima presudna, stanice još uvijek moraju povećati ekspresiju glikolitičkih enzima i glukoznih prenositelja (GLUT) kako bi se uspostavila glikoliza dovoljna za opskrbu stanica raka energijom (López-Lazaro, 2008). Sada se već zna da povećana razina vodikovog peroksida, jedne od reaktivnih kisikovih vrsta, aktivira HIF-1, a on pak igra važnu ulogu u transkripciji gena za glukozne prenositelje i enzime glikolitičkog puta; stanice bez HIF-1 imaju smanjeni glikolitički kapacitet. Vodikov peroksid također može aktivirati Akt (Brooks-Robey i Hay, 2009), te onkogene *ras*, *src* i *myc*, koji su uključeni u sintezu GLUT-ova i glikolitičkih enzima (Kim i Dang, 2006; Dang i sur, 2009; Levine i Puzio-Kuter, 2010). Iako Akt i navedeni onkogeni aktiviraju HIF-1, ne smijemo isključiti mogućnost da se transkripcija GLUT-ova i glikolitičkih enzima inducirana vodikovim peroksidom odvija nezavisno od HIF-1.



Slika 3. Shematski prikaz glavnih metaboličkih puteva u stanici i svih faktora koji utječu na razinu aktivnosti, odnosno reguliraju aktivnost metaboličkih puteva. Na prikazu možemo uočiti da je glikoliza centralni metabolički put dobivanja energije, no prilikom rasta stanica potrebne su građevne jedinice (masne kiseline i nukleinske kiseline) koje se dobivaju drugim metaboličkim putevima reguliranim raznim faktorima (preuzeto sa: <http://www.cellsignal.com>)

4. POSLJEDICE PRELASKA NA GLIKOLIZU

Prije se pretpostavljalo da je glavni razlog prijelaska stanica raka na glikolizu neadekvatna opskrba stanica kisikom. No, iznenađuje činjenica da stanice raka ostaju glikolitičke čak i nakon uspostave efikasne dopreme kisika (Gatenby i Gillies, 2004). Štoviše, količina glukoze koju stanice uzimaju premašuje njihove bioenergetske zahtjeve. Predloženo je da je povećana glikoliza u stanicama raka potrebna za stanični rast, stoga se krajnji produkt glikolize, piruvat, usmjerava prema sintezi lipida potrebnih za sastavljanje membrane. Ključni enzim koji povezuje metabolizam glukoze i sintezu lipida je ATP-citrat-liaza (ACL), koja katalizira pretvorbu citrata u acetil-CoA u citosolu. Inhibicija enzima ACL može suprimirati preživljavanje i proliferaciju stanica raka *in vitro*, te može *in vivo* reducirati tumorski rast i inducirati deferencijaciju. Uz to, prijelaz na glikolitički put i na stvaranje laktata snižava pH vrijednost u stanici, što stanicama raka daje kompetitivnu prednost prilikom invazije (Kim i Dang, 2006; Kondoh, 2008; Levine i Puzio-Kuter, 2010).

Druga važna posljedica prijelaza na glikolitički put je nastanak rezistencije na apoptozu (programiranu staničnu smrt). Defektna apoptoza dovodi do progresije tumora i rezistencije na tretmane (Pecorino, 2008). Poznata su dva signalna puta apoptoze. Vanjski put preko receptora uključuje autokatalitičku pro-kaspazu-8, ključni enzim za aktivaciju cijelog niza efektorskih kaspaza među kojima je i kaspaza-3 zadužena za manifestaciju različitih biokemijskih i morfoloških značajki apoptoze. Unutarnji apoptotički put uključuje permeabilizaciju vanjske membrane mitohondrija nakon koje slijedi otpuštanje citokroma c i drugih proteina iz međumembranskog prostora mitohondrija u citosol. Jednom kada dođe u citosol, citokrom c reagira s adaptorskom molekulom Apaf-1. Nastali spoj rezultira procesiranjem i aktivacijom pro-kaspaze-9, koja cijepa i aktivira pro-kaspaze-3 i 7; ove efektorske kaspaze su odgovorne za cijepanje staničnih proteina nakon čega slijedi stanična smrt. Međutim, prijelaz stanica na glikolizu čini vanjsku membranu mitohondrija manje podložnom permeabilizaciji, te stoga stanice postaju otpornije na staničnu smrt posredovanu mitohondrijima (Gogvadze i sur, 2010).

5. INHIBICIJA GLIKOLIZE: STRATEGIJE I LIJEKOVI

Inhibicija glikolize u tumorskim stanicama se može iskoristiti za razvoj preventivnih lijekova i kemoterapeutika. Glikoliza je esencijalna za procese stanične proliferacije, tumorske invazije i metastaziranje, stoga bi redukcija glikolitičkog kapaciteta tumorskih stanica onemogućila njihovu proliferaciju, invaziju u okružujuća tkiva i migraciju na distalne organe (Smaillbone i sur, 2007; López-Lázaro, 2008; Ferreira, 2010). S druge strane, nekoliko radova je pokazalo da aktivacija glikolize štiti stanicu od stanične smrti inducirane vodikovim peroksidom, te da su stanice raka podložnije takvoj vrsti stanične smrti od normalnih stanica (Kondoh, 2008; Smallbone i sur 2007; Ferreira, 2010). Isto tako, stanice raka više ovise o glikolitičkom ATP-u nego normalne stanice. Navedene činjenice daju uvid u mogućnosti selektivnog ubijanja stanica raka, te kemoterapije.

Nekoliko strategija i lijekova se može koristiti za inhibiciju glikolitičkog metabolizma u stanicama raka. Prvi, i možda najizravniji, način inhibicije glikolize je redukcija nivoa glukoze u krvi koristeći inzulin. Ako nema dovoljno glukoze unutar stanice, glikoliza ne može napredovati, jer nema goriva.

Druga strategija je inhibicija glikolitičkih enzima. Enzimi heksokinaza, fosfofruktokinaza-1 i piruvat-kinaza kataliziraju ireverzibilne reakcije glikolize, te predstavljaju važna mjesta kontrole glikolize. Heksokinaza je prvi enzim glikolitičkog puta, te katalizira najsporiju reakciju tog puta. Katalizira fosforilaciju glukoze u glukozu-6-fosfat, koji ne može slobodno izaći iz stanice i time mu je sudbina predodređena za jedan od metaboličkih puteva u stanici: glikolizu, glikoneogenezu ili put pentoza fosfata (Nelson i Cox, 2005). Nekoliko lijekova je pokazalo obećavajuće rezultate u inhibiciji heksokinaze: lonidamine, derivat indazole-3-karboksilne kiseline, 3-bromopiruvat, analog piruvata, te 2-deoksiglukozu, analog glukoze (Gatenby i Gillies, 2004; López-Lázaro, 2008). Potonji potencijalni lijek, iako učinkovito inhibira heksokinazu, uzrokuje akumulaciju produkta fosforilacije koji se ne može metabolizirati, a koji ima toksičan učinak na organizam. U kliničkoj uporabi već je imatinib kojemu su primarne mete heksokinaza i glukozu-6-fosfat dehidrogenaza. Kao što je već spomenuto, aktivnost fosfofruktokinaze-1 je veoma osjetljiva na male promjene pH u fiziološkom rasponu, pri čemu veći pH povećava aktivnost enzima. Dokazano je da stanice raka imaju niske unutarstanične pH vrijednosti koje omogućavaju aktivaciju fosfofruktokinaze-1. Aktivacija H^+ pumpi, koje vodikove ione izbacuju iz stanice, poput Na^+/H^+ izmjenjivača (NHE-1), se pokazala kao važna karika u povećanju unutarstanične pH vrijednosti, stoga ne čudi da inhibicija takvih pumpi može imati kemoterapijski učinak (Smallbone i sur, 2007). No, važno je napomenuti

da raspon unutarstaničnog pH stanica raka mora ostati između 6.5 i 7.35 (Pecorino, 2008). Trenutno se u tom pogledu ispituju amilorid i 5,5-dimetilamilorid (López-Lázaro, 2008). Također, fosfofruktokinazu-1 inhibira povećana količina citrata. Enzim ATP-citrat-liaza katalizira pretvorbu citrata u citosolni acetyl-CoA (Nelson i Cox, 2005). Inhibicijom citrat-liaze došlo bi do nakupljanja citrata u stanici, a time do inhibicije fosfofruktokinaze-1 i naposljetku glikolize. Istraživanja su pokazala da SB-204990, inhibitor ATP-citrat-liaze, ograničava *in vitro* proliferaciju i preživljavanje stanica raka, te *in vivo* smanjuje tumorski rast time što dovodi do nakupljanja citrata u stanici. Posljednji enzim glikolitičkog puta, piruvat-kinaza, predstavlja dodatnu strategiju za inhibiciju glikolize; čini se da ovaj enzim igra važnu ulogu prilikom tumorskog rasta i invazije, te njegova inhibicija može imati antitumorsko djelovanje (López-Lázaro, 2008).

Enzimi laktat-dehidrogenaza, piruvat dehidrogenaza i kinaza piruvat-dehidrogenaze igraju važnu ulogu u glikolizi, ciklusu limunske kiseline i oksidativnoj fosforilaciji. Laktat-dehidrogenaza katalizira reakciju reduciranja piruvata u laktat, u kojoj se regenerira NAD^+ potreban za nastavak glikolize (Nelson i Cox, 2005). Nedavni rad je pokazao da inhibicija laktat-dehidrogenaze reducira glikolitički metabolizam stanica raka, te da ima antitumorski efekt u animalnim stanicama (Bartrons i Caro, 2007). Autori diskutiraju da pošto individualci koji uopće nemaju laktat-dehidrogenazu ne pokazuju nikakve simptome u normalnim uvjetima, inhibicija laktat-dehidrogenaze predstavlja relativno netoksičan pristup liječenju raka. S druge strane, HIF-1 faktor pomaže ekspresiji kinaze piruvat-dehidrogenaze koja reprimira oksidativnu fosforilaciju inhibicijom piruvat-dehidrogenaze i stoga igra važnu ulogu u aktivaciji aerobne glikolize. Dikloracetat smanjuje glikolizu preko inhibicije kinaze piruvat-dehidrogenaze; već se godinama koristi u ljudi za liječenje laktične acidoze i nasljedne mitohondrijske bolesti. Opaženo je da dikloracetat iz pitke vode pri klinički relevantnim dozama može *in vivo* prevenirati i revertirati tumorski rast bez vidljive toksičnosti (López-Lázaro, 2008).

Sljedeću strategiju predstavlja inhibicija sinteze prenositelja glukoze i enzima glikolitičkog puta. Pošto HIF-1 predstavlja glavnu kariku u ekspresiji glukoznih prenositelja i glikolitičkih enzima, njegova inhibicija sprječava glikolizu i djeluje antitumorski. Nekoliko lijekova, poput topotekana, imatiniba, ibuprofena i sličnih, te neki prirodni spojevi kao resveratrol, genistein, berberin, inhibiraju aktivnost HIF-1 transkripcijskog faktora (Stubbs i Griffiths, 2010).

Naposljetku, glikolitički kapacitet stanice se može smanjiti prevencijom ili smanjenjem velike stanične razine superoksidnog iona i vodikovog peroksida. Korištenjem antioksidanata poput enzima katalaze i molekule PX-478, zaustavila bi se aktivacija HIF-1, time bi se glikolitički kapacitet stanice smanjio, i prevenirao bi se razvoj invazivnih rakova (Pecorino, 2008).

6. ZAKLJUČAK

Unatoč heterogenosti tumora koja diktira individualni pristup liječenju raka, gotovo svi pokazuju povećani unos i korištenje glukoze, fenomen koji se naziva Warburg-ov efekt. Nije još savim jasan točan mehanizam indukcije Warburgovog efekta, no identificirani su neki ključni trenuci koji dovode do prijelaza proizvodnje ATP-a sa OKSFOS-a na glikolizu. Biokemijski dokazi pokazali su da je aktivacija glikolize esencijalna za staničnu proliferaciju, što nam ukazuje na činjenicu, ako bi glikoliza uvijek bila inhibirana u aerobnim uvjetima, stanice se nikada ne bi dijelile. Najveću ulogu u Warburg-ovom efektu igra HIF-1, te reaktivne kisikove vrste koje pokreću cijelu kaskadu odgovora i uzrokuju biokemijske i morfološke promjene stanica. Iako je istraživanje mehanizma Warburg-ovog efekta još uvijek na samim počecima shvaćanja što se događa u stanicama raka, već su se pojavile neke ideje o mogućim strategijama liječenja raka, pa čak i njegove prevencije.

7. LITERATURA

- Bartrons R, Caro J (2007):** Hypoxia, Glucose Metabolism and the Warburg's Effect, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39: 223-229
- Brooks-Robey R, Hay N (2009):** Is Akt the "Warburg kinase"? - Akt-energy Metabolism Interactions, *Seminars in Cancer Biology*, 19: 25-31
- Dang CV, Le A, Gao P (2009):** Myc-induced Cancer Cell Energy Metabolism and Therapeutic Opportunities, *Clinical Cancer Research*, 15(21): 6479-6483
- Dang CV (2010):** Re-thinking the Warburg Effect with Myc Micro-managing Glutamine Metabolism, *Cancer Research*, 70(3): 859-863
- DeBerardinis RJ (2008):** Is Cancer a Disease of Abnormal Cellular Metabolism?: New Angles on an Old Idea, *Genetics in Medicine*, 10(11): 767-777
- DeBerardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB (2008):** Brick by Brick: Metabolism and Tumor Cell Growth, *Current Opinion in Genetics and Development*, 18(1): 54-61
- Endo H, Kamada H, Nito C, Nishi T, Chan PH (2006):** Mitochondrial Translocation of p53 Mediates Release of Cytochrome c and Hippocampal CA1 Neuronal Death After Transient Global Cerebral Ischemia in Rats, *The Journal of Neuroscience*, 26(30): 7974-7983
- Feron O (2009):** Pyruvate Into Lactate and Back: From the Warburg Effect to Symbiotic Energy Fuel Exchange in Cancer Cells, *Radiotherapy and Oncology*, 92: 329-333
- Ferreira LMR (2010):** Cancer Metabolism: The Warburg Effect Today, *Experimental and Molecular Pathology*, 89: 372-380
- Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL (2007):** HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells, *Cell*, 129: 111-122
- Gatenby RA, Gillies RJ (2004):** Why do Cancer Cells Have High Aerobic Glycolysis?, *Cancer*, 4: 891-899
- Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S (2010):** The Warburg Effect and Mitochondrial Stability in Cancer Cells, *Molecular Aspects of Medicine*, 31: 60-74
- Hsu PP, Sabatini DM (2008):** Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond, *Cell*, 134: 703-707
- Kim JW, Dang CV (2006):** Cancer's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect, *Cancer Research*, 66(18): 8927-8930
- Kondoh H (2008):** Cellular Life Span and the Warburg Effect, *Experimental Cell Research*, 314: 1923-1928

- Levine AJ, Puzio-Kuter AM (2010):** The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes, *Science*, 330: 1340-1344
- López-Lázaro M (2008):** The Warburg Effect: Why and How Cancer Cells Activate Glycolysis in the Presence of Oxygen?, *Anti-Cancer Agents in Medical Chemistry*, 8: 305-312
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM (2006):** p53 Regulates Mitochondrial Respiration, *Science*, 312: 1650-1653
- Nelson DL, Cox MM (2005):** Glycolysis, Gluconeogenesis and the Pentose Phosphate Pathway, u: Lehninger Principles of Biochemistry, *WH Freeman and Company*, New York, str. 521-559
- Pecorino L (2008):** Nutrients, hormones and Gene Interactions, u: Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets and Therapeutics, *Oxford University Press*, Oxford, str. 231-257
- Racker E, Spector M (1981):** Warburg Effect Revisited: Merger of Biochemistry and Molecular Biology, *Science*, 213: 303-307
- Ruckenstuhl C, Büttner S, Carmona-Gutierrez D, Eisenberg T, Kroemer G, Sigrist SJ, Fröhlich KU, Madeo F (2009):** The Warburg Effect Suppresses Oxidative Stress Induced Apoptosis in a Yeast Model for Cancer, *Public Library of Science One (PLOS)*, 4(2): 1-6
- Samudio I, Fiegl M, Andreeff M (2009):** Mitochondrial Uncoupling and the Warburg Effect: Molecular Basis for the Reprogramming of Cancer Cell Metabolism, *Cancer Research*, 69: 2163-2166
- Smallbone K, Gatenby RA, Gillies RJ, Maini PK, Gavaghan DJ (2007):** Metabolic Changes During Carcinogenesis: Potential Impact on Invasiveness, *Journal of Theoretical Biology*, 244: 703-713
- Stubbs M, Griffiths JR (2010):** The Altered Metabolism of Tumors: HIF-1 and Its Role in the Warburg Effect, *Advances in Enzyme Regulation*, 50: 44-55
- Vander Haiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009):** Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation, *Science*, 324: 1029-1033
- Warburg O (1956):** On the Origin of Cancer Cells, *Science*, 123: 309-314

<http://www.beilstein-institut.de/ESCEC2009/Proceedings/Auld/Auld.html>

http://www.cellsignal.com/reference/pathway/warburg_effect.html

<http://www.ucl.ac.uk/medicine/cell-signalling/research>

SAŽETAK

Prva istraživanja energetskeg metabolizma tumora provodila su se 1922. godine u laboratoriju Otto Warburga. Warburg je ustanovio specifičan metabolizam stanica raka čija je karakteristika prijelaz s respiracije na fermentaciju - nazvan je Warburg-ov efekt. Warburgov efekt predstavlja glavni razlog transformacije normalnih stanica u tumorske stanice. Tumorske stanice održavaju visoku razinu glikolize, čak i u uvjetima kada je doprema kisika stanicama dostatna, te akumuliraju velike količine laktata. Smatra se da je ovaj efekt važan za besmrtnost i transformaciju stanica, te omogućuje rezistentnost tumorskih stanica na oksidativni stres i adaptaciju stanica na uvjete hipoksije.

Od vremena kada je otkriven ovaj fenomen, odvijala su se mnoga istraživanja koja su pomogla dubljem shvaćanju ovoga procesa. Bolje shvaćanje procesa iznjedrilo je mogućnosti dijagnoze i terapije, no još uvijek Warburgov efekt ne poznajemo dovoljno dobro. Ovaj rad predstavlja pregled činjenica i perspektive Warburg-ovog efekta u 21. stoljeću.

S U M M A R Y

One of the first studies on the energy metabolism of tumors was carried out in 1922, in the laboratory of Otto Warburg. He established that cancer cells exhibited a specific metabolic pattern, characterized by a shift from respiration to fermentation, which has been later named the Warburg effect, and that this is the main cause why normal cells become tumor cells. Here cells maintain a high glycolytic rate even in conditions of adequate oxygen supply, and accumulate large amounts of lactate. This seems to be important in immortalization and transformation of cell as it renders cells resistant to oxidative stress and adaptive to hypoxic condition.

Considerable work has been done since Warburg first discovered this phenomenon, deepening our understanding of the process, with consequences for diagnosis and therapy, but still Warburg effect is not yet completely understood. This review presents facts and perspectives on the Warburg effect for the 21st century.